

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de biochimie médicale

FACULTE DE MEDECINE
Professeur P. FAVARGER
Professeur S. ROUS

EFFET DE LA CARENCE EN BIOTINE SUR L'ACETYL CoA CARBOXYLASE ET LA PYRUVATE CARBOXYLASE DU TISSU ADIPEUX DE SOURIS

THESE

présentée à la faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine —

par

Sylviane PASQUIER

de

Genève

Thèse No 3668

1978

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545932_0015

EFFET DE LA CARENCE EN BIOTINE SUR L'ACETYL CoA CARBOXYLASE ET LA PYRUVATE CARBOXYLASE DU TISSU ADIPEUX DE SOURIS

THESE

présentée à la faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Sylviane PASQUIER

de

Genève

Thèse No 3668

GENEVE

Editions Médecine et Hygiène

1979

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Pierre Favarger et du professeur Simonne Rous, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 26 avril 1978

Le doyen :
André Cruchaud

Thèse No 3668



Je tiens à exprimer aux professeurs Pierre Favarger et Simone Rous
ma plus vive gratitude pour les conseils et les encouragements qu'ils m'ont
prodigués.

Ce travail a été exécuté dans les laboratoires du Département de biochimie médicale de
la faculté de médecine de l'Université de Genève.

A MES PARENTS

INTRODUCTION

Les travaux de différents groupes de chercheurs ont permis d'établir que la biotine est le coenzyme des carboxylases et que l'activité de ces enzymes est réduite chez l'animal supérieur privé de cette vitamine (1-5). Deux parmi ces carboxylases jouent un rôle particulièrement important : l'acétyl CoA carboxylase (ACX), enzyme limitative de la synthèse des acides gras (6-8) et la pyruvate carboxylase (PCX), dont l'action est indispensable pour la conversion d'alanine et d'acide lactique en glucose. Ces deux substances constituent les meilleurs substrats de la gluconéogénèse chez l'animal à jeun ou diabétique.

Il n'est donc pas étonnant que de nombreux travaux aient été déjà effectués à propos de ces carboxylases, mais ceux-ci ont surtout eu pour objet les enzymes du foie, organe impliqué de façon intensive à la fois dans la gluconéogénèse et la lipogénèse. Il n'était pas inutile, cependant, de réaliser une étude comparable sur le tissu adipeux, car la synthèse des acides gras s'y accomplit avec plus d'intensité que dans le foie (9) et la pyruvate carboxylase y est également active (10, 11). Si cette dernière ne sert pas à la gluconéogénèse dans ce tissu, par suite notamment de l'absence de glucose-6-phosphatase, elle y est cependant utile à l'estérification. Grâce à elle, en effet, chez l'animal à jeun, le lactate peut être converti en glycérophosphate.

A notre connaissance, aucun travail n'a été entrepris pour étudier parallèlement la répercussion d'une carence en biotine sur ces deux carboxylases dont les actions sont étroitement liées. De plus, seule l'influence d'une carence en biotine sur la synthèse des acides gras et l'acétyl CoA carboxylase du tissu adipeux a été étudiée (12, 13). C'est pourquoi nous avons tout d'abord comparé l'effet d'un régime dépourvu de biotine sur l'incorporation d'acétate $1-^{14}\text{C}$ dans les acides gras totaux du tissu adipeux de souris et sur les activités des acétyl CoA et pyruvate carboxylases. Nous avons également recherché

si le citrate et l'insuline, respectivement effecteur allostérique (14-17) et hormone activatrice de l'acétyl CoA carboxylase étaient capables de lever l'inhibition exercée par la carence en biotine sur cette enzyme. Une autre raison nous a conduit à comparer les effets de la carence en biotine sur ces deux enzymes. Il avait, en effet, été observé que l'acétyl CoA carboxylase du tissu adipeux était plus sensible à cette carence que l'enzyme du foie (18, 19). La différence de réponse entre ces deux organes était restée inexplicée. La comparaison des effets de la carence sur deux enzymes différentes du tissu adipeux devait nous permettre de savoir si la biotine était plus limitative dans ce tissu que dans le foie ou si, par exemple, seule l'acétyl CoA carboxylase était plus affectée par cette carence. Ceci aurait laissé supposer que le rapport des concentrations acétyl CoA carboxylase/pyruvate carboxylase était plus élevé dans ce tissu que dans le foie. D'autre part, peu de renseignements ont été fournis sur la localisation intracellulaire de la synthèse des différents acides gras dans le tissu adipeux. Les mécanismes analogues à ceux décrits pour le foie ont été proposés. Le premier, mécanisme cytoplasmique dit de condensation fait intervenir le malonyl CoA et est de loin le plus actif. Son principal produit est l'acide palmitique (20). Deux mécanismes, en revanche, semblent impliqués dans la synthèse de l'acide stéarique; l'un, mitochondrial (21-24) allonge au moyen d'acétyl CoA l'acide palmitique en acide stéarique; le second, microsomal, réalise une élongation semblable, mais cette fois aux dépens du malonyl CoA (25-27). La participation respective de ces mécanismes dans le tissu adipeux n'était pas connue; il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'effet d'une carence en biotine sur la synthèse de l'acide stéarique. Si cet acide faisait intervenir le mécanisme d'élongation microsomale pour se former, autrement dit le malonyl CoA, sa synthèse devrait être tout particulièrement affectée par une carence en biotine.

De plus une controverse existe quant à l'origine de l'acide oléique (28, 29). S'il n'y a aucun doute que cet acide peut être formé par désaturation de l'acide stéarique, au niveau du réticulum endoplasmique (30-34), l'existence d'un mécanisme permettant la synthèse de novo de cet acide a également été proposé. Dans cette dernière éventualité,

l'acide oléique devrait avoir une sensibilité différente à la carence en biotine que l'acide stéarique. Afin de tester ces hypothèses, nous avons administré de l'acétate $1-^{14}\text{C}$ à des souris ayant reçu un régime carencé ou non en biotine, isolé les acides gras des différentes fractions cellulaires par chromatographie gaz-liquide et mesuré leur radioactivité après avoir testé la pureté des fractions obtenues par centrifugation sur gradient de densité au moyen des enzymes "marqueuses".

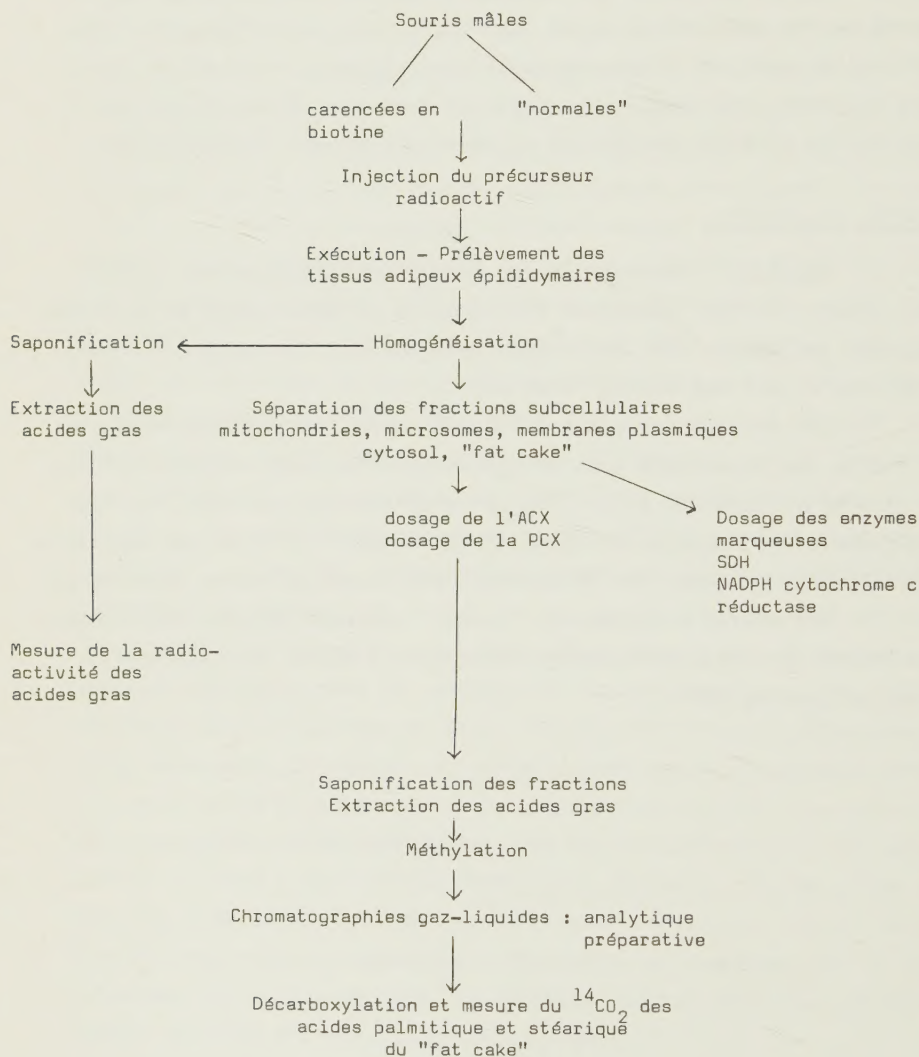
MATERIEL et METHODES

Animaux.— Les expériences sont effectuées avec des souris mâles (Swiss albinos) provenant de l'élevage du Département de Biochimie médicale; les essais sont faits parallèlement sur des souris carencées en biotine et sur des souris "normales".

Les souris soumises à un régime carencé en biotine reçoivent ad libitum une nourriture dont la composition est très voisine de celle que proposent Wilson et coll. (35), à la différence près que l'ovalbumine commerciale remplace le blanc d'oeuf et que l'avidine est supprimée. Ce traitement, commencé dès le sevrage, est poursuivi durant 8 semaines.

Les souris à régime dit "normal" ingèrent la même alimentation mais boivent de l'eau additionnée de biotine 3 mg/ml, soit environ 27 μg /jour/souris (36).

Schéma général des techniques utilisées



Traitement des animaux.- Dans l'expérience no. 1, les souris sont réparties en 3 groupes, celles du premier groupe sont à jeun depuis 12 heures; les animaux du second groupe ont reçu intrapéritonéalement 0.1 unité d'insuline 30 minutes avant l'injection intraveineuse du précurseur radioactif, le pyruvate 3-¹⁴C (5 µCi/souris), lui-même administré 15 minutes avant le sacrifice.

Dans l'expérience no. 3 (cf. tableau 5), les souris reçoivent comme précurseur radioactif de l'acétate 1-¹⁴C (114 µCi) en injection intraveineuse (veine caudale) 3 minutes avant l'exécution.

Homogénéisation.- Les tissus adipeux épidydimaires sont prélevés aussitôt après l'exécution des animaux, pesés et homogénéisés à 20°C dans 2 volumes de tampon (saccharose 0,25 M, Tris 1 mM, EDTA 0,1 mM, mercaptoéthanol 1 mM, pH 7,4) au moyen d'un potter en verre et d'un piston (clearance : 0,3 mm) grâce à 6 aller-retours lents, le piston tournant à 1780 tours/minute.

Séparation des fractions subcellulaires.- Une première centrifugation de l'homogénat 10 minutes à 2'500 - 3'000 g permet d'éliminer les noyaux et débris cellulaires et de recueillir la fraction "fat cake" qui surnage. Une seconde centrifugation de la fraction intermédiaire pendant 10 minutes à 13'000 g fait sédimenter les mitochondries. Le surnageant correspondant est à nouveau centrifugé pendant 60 minutes à 100'000 g, les microsomes précipitent et le surnageant correspondant au cytosol est recueilli.

Dans l'expérience no. 3, les mitochondries ont subi une purification supplémentaire par centrifugation pendant 30 minutes à 100'000 g sur un gradient de Ficoll constitué comme suit : 0,2 ml saccharose 60 %, 0,45 ml Ficoll 20 %, 0,864 ml Ficoll 17,5 %, 0,756 ml Ficoll 15 %, 0,684 ml Ficoll 12,5 %, 0,612 ml Ficoll 10 %, 0,436 ml Ficoll 7,5 %, 0,45 ml Ficoll 5 %.

Les membranes plasmiques ont été séparées des mitochondries par centrifugation pendant 30 minutes à 100'000 g (rotor SW 50) sur saccharose 1145.

Vérification de la pureté des fractions.- La pureté des fractions a été vérifiée par dosage des enzymes marqueuses suivantes : la succinodéshydrogénase, enzyme mitochondriale, et la NADPH cytochrome c réductase, enzyme microsomale (37, 38).

Dosage enzymatique de l'acétyl CoA carboxylase.- L'acétyl CoA carboxylase, enzyme cytoplasmique, est dosée sur le surnageant 100'000 g de l'homogénat primitif, par la technique de Greenspan et Löwenstein (39).

Dans l'expérience no. 2, différentes conditions de dosage ont été utilisées : absence totale de citrate, présence de citrate uniquement dans le tampon d'activation ou présence de citrate dans les deux milieux.

Dosage enzymatique de la pyruvate carboxylase.- Afin de pouvoir doser la pyruvate carboxylase, enzyme intra-mitochondriale, l'homogénat refroidi par un mélange glace-NaCl, puis centrifugé 10 minutes à 1'000 g est traité aux ultra-sons (puissance 50 W, position 5) 4 fois pendant 10 secondes avec des arrêts de 10 secondes. Le dosage est effectué sur le surnageant selon Freedman et Kohn (40).

Microdétermination des protéines.- La méthode utilisée est celle de Lowry (41).

Détermination de la radioactivité des acides gras.- Une fraction de l'homogénat est saponifiée pendant 2 heures en présence de 200 mg de KOH et 5 ml d'éthanol. Les acides gras sont ensuite extraits à l'éther de pétrole après élimination de l'insaponifiable (42). La radioactivité des acides gras est mesurée par scintillation liquide (10 ml d'une solution contenant 5 g PPO et 300 mg POPOP/litre de toluène).

Chromatographies de partage gaz-liquide, analytique, préparative.-

Les acides gras des différentes fractions mitochondries, microsomes, membranes plasmiques, cytosol, "fat cake", sont saponifiés pendant 2 heures au moyen de potasse alcoolique, puis extraits, méthylés (43) et

finalement analysés par chromatographie de partage gaz-liquide (appareil : Aerograph 90 P; colonne de 5 pieds, $\varnothing$ 2 mm, 15 % DEGS sur chromosorb W, 60/80 mesh, 180°C; détecteur : catharomètre 270°C; injecteur 280°C; gaz : hélium, 2,6 bar, 25 ml/min.; filament : 150 mA). Ensuite la chromatographie de partage gaz-liquide préparative (appareil : Aerograph A-700; colonne 10 pieds, 5 % Apiezon sur Aeropack, 205°C; détecteur : catharomètre, 305°C; injecteur 280°C; collecteur 215°C; gaz : hélium 2,4 bar, 80 cm³/min.; filament 150 mA) permet de recueillir séparément les acides palmitique, stéarique et oléique.

Décarboxylation.— La décarboxylation des acides gras (réaction de Schmidt (44)) est effectuée selon une méthode adoptée pour de petites quantités et permettant la mesure directe de la radioactivité par scintillation liquide (45).

RESULTATS

Comme on peut le voir sur le tableau No 1, la carence en biotine diminue significativement l'activité de la pyruvate carboxylase chez les souris nourries, chez les souris à jeun depuis 12 h. et chez les souris ayant reçu 0,1 unité d'insuline par voie intrapéritonéale 45 min. avant l'exécution. L'insuline a une faible action

TABLEAU 1

ACTION D'UNE CARENCE EN BIOTINE SUR L'ACTIVITE DE LA PYRUVATE CARBOXYLASE (PCX)

	nmoles de CO ₂ incorporé par minute par mg de protéine	Rapport N/C	nmoles de CO ₂ incorporé par minute par le tissu adipeux	Rapport N/C
Animaux nourris normaux	0,74 ± 0,05 n = 5	1,31	0,50 ± 0,07 n = 5	3,10
Animaux nourris carencés	0,56 ± 0,08 n = 4		0,16 ± 0,06 n = 4	
Animaux + insuline normaux	1,01 ± 0,22 n = 4	1,67	0,76 ± 0,18 n = 4	6,33
Animaux + insuline carencés	0,61 ± 0,06 n = 5		0,12 ± 0,03 n = 5	
Animaux à jeun 12 h. normaux	0,54 ± 0,08 n = 5	1,18	0,46 ± 0,08 n = 5	3,02
Animaux à jeun 12 h. carencés	0,46 ± 0,09 n = 4		0,15 ± 0,08 n = 4	

n = nombre d'animaux

TABLEAU 2

MESUREE IN VITRO ET SUR L'INCORPORATION D'ACETATE 1-¹⁴C DANS LES ACIDES GRAS DU
TISSU ADIPEUX DE LA SOURIS VIVANTE

IN VITRO :	nmoles de CO ₂ incorporé par minute par mg de protéine	Rapport N/C	nmoles de CO ₂ incorporé par minute par le tissu adipeux (organe)	Rapport N/C
Animaux nourris normaux	3,77 ± 0,89 n = 5	1,50	16,03 ± 3,45 n = 5	2,93
Animaux nourris carencés	2,51 ± 0,46 n = 4	.	5,13 ± 2,40 n = 4	
Animaux + insuline normaux	3,52 ± 0,63 n = 4	1,43	14,00 ± 4,76 n = 4	3,32
Animaux + insuline carencés	2,46 ± 0,36 n = 5		4,22 ± 1,74 n = 5	
Animaux à jeun 12 h. normaux	3,63 ± 0,57 n = 5	1,47	14,68 ± 2,17 n = 5	2,70
Animaux à jeun 12 h. carencés	2,47 ± 0,33 n = 5		5,42 ± 2,07 n = 5	
IN VIVO :	dpm/mg acides gras		dpm/tissu adipeux	
Animaux nourris normaux	9,65 ± 1,10 n = 4	1,21	545,32 ± 99,17 n = 5	1,51
Animaux nourris carencés	7,98 ± 1,65 n = 4		341,46 ± 110,97 n = 4	
Animaux à jeun 12 h. normaux	22,9 ± 4,2 n = 5	1,12	446,51 ± 38,24 n = 4	1,07
Animaux à jeun 12 h. carencés	20,4 ± 4,74 n = 5		416,99 ± 55,00 n = 5	

n = nombre d'animaux

stimulatrice sur l'activité de la PCX chez les témoins, mais ne modifie pas l'effet de la carence. Un jeûne de 12 h. ne provoque pas de stimulation de l'activité de la pyruvate carboxylase dans ce tissu (tableau 1).

L'activité de l'acétyl CoA carboxylase (tableau 2) est réduite dans le tissu adipeux épididymal de souris par la carence en biotine dans les trois conditions choisies : souris nourries, à jeun depuis 12 heures ou ayant reçu une injection intrapéritonéale de 0,1 unité d'insuline 45 minutes avant le sacrifice. L'insuline n'exerce aucune action sur l'activité de l'acétyl CoA carboxylase dans nos conditions expérimentales, aussi bien chez les animaux témoins que chez les carencés.

TABLEAU 3

INFLUENCE DU CITRATE SUR L'ACTIVITE DE L'ACÉTYL CoA CARBOXYLASE (ACX) DU TISSU ADIPEUX
DE SOURIS NORMALES OU CARENCÉES EN BIOTINE

	nmoles de CO ₂ incorporé par minute par mg de protéine	Rapport N/C	nmoles de CO ₂ incorporé par minute par pool de tissu adipeux	Rapport N/C
<u>Conditions de dosage</u> : Citrate présent dans le milieu de préincubation et d'incubation				
Animaux normaux	1,51 ± 0,48 n = 4	2,24	10,91 ± 2,49 n = 4	3,32
Animaux carencés	0,67 ± 0,17 n = 4		3,29 ± 0,89 n = 4	
<u>Conditions de dosage</u> : Citrate présent uniquement dans le milieu de préincubation				
Animaux normaux	0,47 ± 0,22 n = 4	1,78	3,34 ± 1,47 n = 4	2,44
Animaux carencés	0,26 ± 0,07 n = 4		1,37 ± 0,30 n = 4	
<u>Conditions de dosage</u> : Absence de citrate dans le milieu de préincubation et d'incubation				
Animaux normaux	0,51 ± 0,25 n = 4	2,20	3,53 ± 1,46 n = 4	3,84
Animaux carencés	0,23 ± 0,11 n = 4		0,92 ± 0,25 n = 4	

n = nombre d'animaux

In vivo, en revanche, les effets de la carence en biotine ne sont pas significatifs, mais ne vont que légèrement dans le sens d'une inhibition. Un jeûne de 12 heures seulement ne diminue pas la synthèse des acides gras dans ce tissu chez les souris témoins.

La plus forte activité de l'acétyl CoA carboxylase (tableau 3) est observée lorsque le citrate, activateur allostérique de l'enzyme, est présent à la fois dans le tampon de préincubation (stade d'activation de l'enzyme) et dans celui d'incubation (dosage proprement dit), c'est-à-dire, en présence de son substrat, l'acétyl CoA. Le citrate ne modifie pas significativement l'effet de la carence en biotine.

Les différents acides gras se répartissent de façon assez semblables dans les différentes fractions subcellulaires (tableau 4). Une plus grande proportion d'acide stéarique est également constatée dans les mitochondries et les membranes plasmiques, la composition de ces deux fractions étant assez voisine. En revanche, dans les microsomes, c'est l'acide palmitique qui prédomine, comme d'ailleurs dans le surnageant et le "fat cake" où est également présente une quantité importante d'acide laurique. Ce dernier acide est, avec l'acide palmitique, un des constituants les plus importants du régime alimentaire des animaux.

Si l'on considère essentiellement les 3 acides gras les plus répandus dans l'organisme, soit les acides palmitique, stéarique et oléique, les effets les plus importants de la carence en biotine sur leur répartition dans le tissu adipeux épidydimal sont :

- dans les mitochondries, une diminution principalement de l'acide stéarique, puis de l'oléique, avec augmentation relative de l'acide palmitique et du désaturé correspondant, le palmitoléique;
- dans les microsomes, une réduction de l'acide stéarique au profit des acides oléique et linoléique;
- dans les membranes plasmiques, une baisse de l'acide stéarique avec accroissement des acides myristique et palmitoléique;
- dans le surnageant, une augmentation de l'acide oléique avec disparition de l'acide laurique;
- sur le "fat cake", une augmentation de l'acide laurique et une diminution du palmitoléique.

TABEAU 4

INFLUENCE DE LA CARENCE EN BIOTINE SUR LA COMPOSITION DES ACIDES GRAS

ACIDES GRAS :	MITOCHONDRIES		MICROSOMES		MEMBRANES PLASMIQUES		SURNAMEANT		FAT CAKE		Composition en acides gras du régime des animaux normaux et carencés %
	animaux normaux carencés		animaux normaux carencés		animaux normaux carencés		animaux normaux carencés		animaux normaux carencés		
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
Laurique	-	-	-	-	-	-	25,68	-	18,74	27,81	29,64
Myristique	2,27	7,95	1,66	0,98	1,18	5,21	2,28	3,58	2,50	2,74	0,53
Myristolique	0,65	3,90	-	0,98	-	2,19	-	1,37	-	1,08	-
Palmitique	25,45	37,30	32,18	33,27	31,54	33,76	27,04	34,45	27,89	25,14	65,45
Palmitolique	4,74	7,11	7,19	5,90	4,38	12,13	12,55	8,21	15,46	7,30	-
Margarique	0,83	1,70	8,30	0,37	-	-	0,43	0,41	-	0,22	-
Margarolique	1,16	0,90	4,27	0,56	0,76	-	1,05	1,92	0,91	1,49	-
Stéarique	37,54	16,92	25,04	15,87	33,00	13,86	8,51	8,14	0,80	1,59	-
Oléique	24,34	18,10	21,36	33,85	24,28	28,46	18,76	35,09	23,39	24,29	2,27
Linoléique	3,02	6,12	-	8,22	4,86	4,39	3,70	6,83	10,31	8,34	2,11

Le tableau 5 nous montre la répartition de la radioactivité retrouvée dans les acides gras des différentes fractions cellulaires du tissu adipeux épидидymal de souris ayant reçu une injection IV d'acétate 1-¹⁴C et qui ont été exécutées 3 minutes plus tard. La radioactivité totale était fortement abaissée dans cette expérience par la carence en biotine; la quantité de radioactivité retrouvée dans les acides gras passe en effet de 3.533.228 pour les témoins à 100.825 pour les souris carencées. La proportion la plus importante de radioactivité se retrouve dans le "fat cake" (plus de 90 %) aussi bien chez les nourries que chez les carencées. L'acide gras le plus affecté par la carence est l'acide palmitique qui ne renferme plus que 87,6 % de la radioactivité totale chez les souris carencées pour 94,7 % chez les témoins. Le stéarique est moins inhibé puisque l'on retrouve dans cet acide 7,8 % de la radioactivité pour 2 % chez les témoins.

Le pourcentage de radioactivité retrouvé dans le COOH des acides gras du "fat cake" par rapport à la molécule entière, est plus élevé chez les souris carencées. Ainsi pour l'acide palmitique, on obtient 16,26 % au lieu des 12,5 % théoriques, très voisins de la valeur trouvée pour les témoins (12 %), les valeurs correspondantes pour l'acide stéarique étant pour les souris témoins 25 % et pour les carencées 37 %.

Les différences d'activité de la succinodeshydrogénase, enzyme marqueuse mitochondriale, et de la NADPH cytochrome c réductase, enzyme microsomale, montrent que ces fractions sont contaminées les unes par les autres (tableau 6). Toutefois, si les membranes plasmiques renferment une forte proportion de mitochondries, en revanche le degré de pureté des mitochondries et des microsomes, fractions qui nous intéressaient le plus directement, peut être considéré comme satisfaisant si l'on se fonde sur les résultats obtenus par d'autres auteurs.

TABLEAU 5

ACTION D'UNE CARENCE EN BIOTINE SUR L'INCORPORATION DE L'ACETATE 1-¹⁴C
DANS LES ACIDES GRAS DES DIFFÉRENTES FRACTIONS SUBCELLULAIRES DU TISSU ADIPEUX DE SOURIS

		Poids des différents acides gras du tissu adipeux		Activité spécifique dpm/mg	Activité totale dpm	Rapport N/C	% total
		en %	en mg				
<u>Mitochondries</u>							
Palmitique	N	0,008	0,71	3,214	2,282	3,10	0,064
	C	0,181	0,69	1,066	736		0,730
Stéarique	N	0,012	1,05	997	1,047	3,34	0,030
	C	0,081	0,31	1,013	314		0,311
Oléique	N	0,003	0,68	434	295	2,38	0,008
	C	0,086	0,33	376	124		0,123
<u>Microsomes</u>							
Palmitique	N	0,037	3,19	1,447	4,618	5,49	0,130
	C	2,100	0,80	1,052	841		0,834
Stéarique	N	0,029	2,48	1,008	2,500	2,29	0,071
	C	0,099	0,38	2,868	1,090		1,081
Oléique	N	0,025	2,11	317	670	2,11	0,019
	C	2,12	0,81	392	317		0,314
<u>Membranes plasmiques</u>							
Palmitique	N	0,007	0,60	2,337	1,402	4,44	0,039
	C	0,210	0,32	985	315		0,312
Stéarique	N	0,007	0,63	2,633	1,659	9,41	0,047
	C	0,034	0,13	1,356	176		0,175
Oléique	N	0,005	0,46	579	266	3,66	0,008
	C	0,071	0,27	270	72		0,071

Poids des différents acides gras du tissu adipeux		en %	en mg	Activité spécifique dpm/mg	Activité totale dpm	Rapport N/C	% total
<u>Surnageant</u>							
Palmitique	N	0,032	2,72	9,286	25,260	21,51	0,715
	C	0,352	1,34	876	1,174		1,164
Stéarique	N	0,010	0,86	6,026	5,182	20,46	0,146
	C	0,084	0,32	791	253		0,251
Oléique	N	0,022	1,89	851	1,608	12,05	0,045
	C	0,359	1,37	97	133		0,132
<u>"Fat cake"</u>							<u>COOH en %</u>
Palmitique	N	53,44	4,503,87	735	3,312,596	38,84	93,756
	C	48,35	184,10	463	85,299		84,601
Stéarique	N	1,53	129,19	471	60,900	10,15	1,724
	C	3,06	11,65	514	5,997		5,947
Oléique	N	44,80	3,777,18	29	112,937	28,38	3,196
	C	46,72	177,88	22	3,979		3,946
<u>TOTAL</u>		8,427,6 mg 380,7 mg			3,533,228 100,825	Palmitique Stéarique Oléique	N 94,70 % C 87,60 % N 2,00 % C 7,80 % N 3,30 % C 4,60 %

TABLEAU 6

CONTROLE DE LA PURETE DES FRACTIONS SUBCELLULAIRES PAR DOSAGE DES ENZYMES "MARQUEUSES"

	Activité SDH μmoles/mg protéine/min.	Activité NADPH cytochrome c reductase μmoles/mg protéine/min
<u>Animaux normaux</u>		
Mitochondries	743,29	44,11
Microsomes	37,08	250,11
Membranes plasmiques	248,45	51,46
<u>Animaux carencés</u>		
Mitochondries	536,34	0,00
Microsomes	140,56	183,14
Membranes plasmiques	491,74	67,57

DISCUSSION

Les différents résultats de ce travail nous ont permis de constater que, tout comme le foie, le tissu adipeux est extrêmement sensible à la carence en biotine, comme en témoignent les importantes baisses d'activité de l'acétyl CoA et de la pyruvate carboxylase survenant chez les animaux carencés.

Un fait semble particulièrement intéressant à signaler à ce propos : l'inhibition est sensiblement du même ordre sur ces deux enzymes dans le tissu adipeux alors que dans le foie un autre travail de notre laboratoire a montré que la PCX était beaucoup plus inhibée que l'ACX (36). Ceci laisserait supposer que l'ACX existerait en quantité beaucoup plus importante dans le tissu adipeux que dans le foie et qu'elle n'est pas limitative dans ce tissu. En effet, puisque, au cours des dosages in vitro, c'est l'activité potentielle totale d'une enzyme qui est mesurée, le retentissement d'une carence en biotine doit apparaître plus nettement sur une enzyme existant à des concentrations très importantes que sur une enzyme limitative. Ainsi lorsque l'on mesure l'activité in vitro de la PCX du foie, qui existe in vivo en quantité très importante (46) et n'est pas saturée par son substrat, le pyruvate (47), on observera pour les souris carencées une inhibition très forte alors qu'au contraire, in vivo, il pourra rester assez de molécules de pyruvate carboxylase saturée en biotine à disposition pour métaboliser la totalité du pyruvate endogène. Dans le tissu adipeux les quantités de biotine nécessaires pour activer les molécules présentes de pyruvate carboxylase et d'acétyl CoA carboxylase seraient peut-être sensiblement identiques.

La stimulation de l'activité de la PCX chez les souris témoins par l'insuline n'est pas aussi étonnante que cela pourrait paraître puisque cette enzyme est utile à d'autres métabolismes que la gluconéogénèse et qu'il s'agit d'une enzyme anaplérotique. D'ailleurs cette stimulation avait déjà été constatée par d'autres auteurs (48).

Le citrate ne peut se substituer à la biotine pour rétablir l'activité de l'acétyl CoA carboxylase dans nos conditions expérimentales. Ce résultat est en accord avec l'observation de Landman et Dakshinamurti (50) qui ont montré que la présence de biotine sur l'acétyl CoA carboxylase constitue une étape préliminaire indispensable à la polymérisation de l'enzyme puis à son activation. De même l'insuline n'a exercé aucun effet stimulateur sur l'activité de l'ACX des animaux carencés mesurée in vitro.

La carence en biotine altère différemment la composition des acides gras des différentes fractions subcellulaires du tissu adipeux. Dans les fractions constituées principalement d'éléments membranaires, et qui renferment donc une proportion importante d'acide stéarique, c'est principalement cet acide qui voit sa concentration s'abaisser. Dans le "fat cake" qui ne constitue qu'un lieu de stockage des acides gras, des quantités 10 fois moindres de stéarique sont retrouvées dans le tissu adipeux des souris carencées que dans celui des souris normales, alors que les acides palmitique et oléique, de beaucoup les plus abondants, diminuent de 20 fois.

L'examen de la radioactivité retrouvée dans les acides gras montre que dans le tissu adipeux, de même que dans le foie, l'acide gras le plus activement synthétisé est l'acide palmitique et ce, aussi bien chez les souris normales que chez les souris carencées en biotine. L'absence de biotine affecte tout particulièrement la synthèse de cet acide.

Si le "fat cake" est incapable, comme cela semble admis, de synthétiser ses propres acides gras, les fractions qui semblent principalement entrer en ligne de compte pour les lui fournir seraient les microsomes et le surnageant. L'importance de la radioactivité retrouvée dans le "fat cake" par rapport à celle des autres fractions montre la rapidité avec laquelle les acides gras néosynthétisés abandonnent leur lieu de synthèse pour se rendre dans la vacuole lipidique. Le fait que la synthèse globale de l'acide stéarique soit moins sensible à la carence en biotine que celle du palmitique semble paradoxal si l'on admet, comme c'est maintenant généralement le cas, que la synthèse de l'acide stéarique procède

surtout par le mécanisme d'élongation microsomale (51). En effet cette élongation s'effectue au moyen de malonyl CoA qui est lui-même sous la dépendance de l'acétyl CoA carboxylase. Il semble donc que chez les animaux carencés, le système d'élongation mitochondriale, qui ne fait pas intervenir le malonyl CoA mais l'acétyl CoA, prend le pas sur le mécanisme d'élongation microsomale, et qu'une partie du stéarique retrouvée dans le réticulum est originaire des mitochondries. Une autre explication serait que la β oxydation ou quelque autre procédé permettant au tissu adipeux de se débarrasser des acides gras fasse disparaître moins efficacement le stéarique que l'acide palmitique chez les animaux carencés. Cependant, ceci n'expliquerait pas pourquoi le pourcentage de radioactivité retrouvé dans le carboxyle de l'acide stéarique augmente chez les animaux carencés. Une autre élongation que l'élongation microsomale qui utilise le malonyl CoA a donc bien dû fonctionner.

Nous avons limité notre discussion aux acides gras du "fat cake" dont les résultats semblent sûrs, contrairement à ceux des différentes fractions isolées qui, étant trop peu abondants et relativement peu marqués, sont trop entachés d'erreur. Nous avons en effet choisi pour étudier l'influence de la carence en biotine sur la synthèse des acides gras dans les différentes fractions subcellulaires, des souris dont l'état de carence était avancé. Ceci explique qu'une inhibition importante de la synthèse des acides gras ait été constatée, contrairement aux résultats qui ont été présentés dans le tableau No 2. Les conditions correspondant à ces dernières valeurs avaient été choisies dans le but d'établir un parallélisme entre l'effet d'un déficit en biotine sur l'acétyl CoA carboxylase et sur la synthèse des acides gras. Nous avons pu ainsi mettre en évidence une dissociation très nette entre la baisse d'activité de l'enzyme et l'action sur la synthèse des acides gras : alors que l'activité de l'enzyme diminuait d'environ 3 fois chez les animaux carencés, nous n'avons pu observer d'inhibition significative sur la synthèse des acides gras, ce qui pouvait exclure que l'acétyl CoA carboxylase du tissu adipeux contrôle, comme celle

du foie, la synthèse des acides gras.

En raison de la rapidité avec laquelle les acides gras sont néosynthétisés et métabolisés au sein de différentes fractions cellulaires, il est difficile d'évaluer leur importance respective dans la synthèse de tel ou tel acide. Cependant, certaines conclusions intéressantes peuvent être tirées de ce travail :

1. La sensibilité toute particulière du tissu adipeux à la carence en biotine qui inhibe aussi bien l'ACX que la PCX;
2. le fonctionnement du système d'élongation mitochondriale peut suppléer efficacement le système d'élongation microsomale pour synthétiser l'acide stéarique chez les souris carencées en biotine;
3. l'acétyl CoA carboxylase du tissu adipeux, contrairement à celle du foie, ne semble pas être une enzyme limitative.

BIBLIOGRAPHIE

1. KOSOW D.P. and LANE M.D. (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 92-95.
2. DEODHAR A.D. and MISTRY S.P. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 755-759.
3. ARINZE J.C. and MISTRY S.P. (1971) Comp. Biochem. Physiol. 38 B, 285-294.
4. MAYOBRE M.-L. (thèse en préparation)
5. WAGLE S.R. (1966) Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 121, 15-19.
6. VAGELOS P.R. (1964) Ann. Rev. Biochem. 33, 139-172.
7. LANE M.D., MOSS J., RYDER E. and STOLL E. (1971) Adv. Enz. Regul. 9, 237-251.
8. NUMA S., NAKANISHI S., HASHIMOTO T., IRITANI N. and KAZAKI T. (1970) Vitam. Horm. (New York) 28, 213-243.
9. FAVARGER P.F. and GERLACH J. (1958) Helv. Physiol. Acta 16, 188-200.
10. WISE E.N. and BALL E.G. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. US 52, 1255-1263.
11. BALLARD F.J., HANSON R.W. and RESHEF L. (1970) Biochem. J. 119, 735-742.
12. DESJARDINS P.R. and DAKSHINAMURTI K. (1969) Fed. Proc. 28, 1657
13. DAKSHINAMURTI K. and DESJARDINS P.R. (1969) Biochim. Biophys. Acta 176, 221-229.
14. MARTIN D.B. and VAGELOS P.R. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1787-1792.
15. VAGELOS P.R., ALBERTS A.W. and MARTIN D.B. (1963) J. Biol. Chem. 238, 533-540.
16. GREGOLIN C., RYDER E. and LANE M.D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4227-4235.
17. GREGOLIN C., RYDER E., WARNER R.C., KLEINSCHMIDT A.G., CHANG H.C. and LANE M.D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4236-4245.
18. DESJARDINS P.R. and DAKSHINAMURTI K. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 142, 292-298.
19. JACOB R. and MAJERUS P.W. (1970) Fed. Proc. 29, 735
20. BRESLER R. and WAKIL S.J. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1441-1448.

21. HARLAN W.R. and WAKIL S.J. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3216-3223.
22. BARRON E.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 116, 425-440.
23. QUAGLIARIELLO E., LANDRISCINA C. and CORATELLI P. (1968) Biochim. Biophys. Acta 164, 12-24.
24. SEUBERT W., LAMBERTS I., KRAMER R. and OHLY B. (1968) Biochim. Biophys. Acta 164, 498-517.
25. NUGTEREN D.H. (1965) Biochim. Biophys. Acta 106, 280-290.
26. GUCHHAIT R.B., PUTZ G.R. and PORTER J.W. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 117, 541-549.
27. LANDRISCINA C., GNONI G.V. and QUAGLIARIELLO E. (1970) Biochim. Biophys. Acta 202, 405-414.
28. RAJU P.K. and REISER R., (1969) Biochim. Biophys. Acta 176, 48-53.
29. ROUS S. (1962) Comptes Rendus Acad. Sci. 254, 3446-3448.
30. MARSH J.B. and JAMES A.T. (1962) Biochim. Biophys. Acta 60, 320-328.
31. NAGAI J. and BLOCH K. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3702-3703.
32. JONES P.D., HOLLOWAY P.W., PELUFFO R.D. and WAKIL S.J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 744-754.
33. GURR M.I., ROBINSON M.P. and JAMES A.T. (1969) Eur. J. Biochem. 9, 70-78.
34. LANDRISCINA C., GNONI G.V. and QUAGLIARIELLO E. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 188-196.
35. WILSON J.W., LEDUC E.H. and WINSTON D.H. (1949) J. Nutrition. 38, 73-86.
36. MAYOBRE M.L., VEUTHEY F., ROUS S. et FAVARGER P. (1975) Comptes rendus des séances de la Société de Biologie, 169, 892-898.
37. BACHMANN E., ALLMAN D.W. and GREEN D.E. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 115, 153-164.
38. HODGES T.K. and LEONARD R.J. (1974) Methods in Enzymology, vol. XXXII, part B, Academic Press, New York, 397-398.
39. GREENSPAN M.D. and LOWENSTEIN J.M. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6273-80.
40. FREEDMAN A.D. and KOHN L. (1964) Science 145, 58-60.
41. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951) 265-275.
42. KAPLAN A. and CHAIKOFF J.L. (1935) J. Biol. Chem. 108, 201-216.
43. LASKER R. and THEILHACKER G.H. (1962) J. Lipid Res. 3, 60-64.
44. SCHMIDT K.F., cité par Fieser L.F. and Fieser M.: "Advanced Organic Chemistry", Reinhold Publishing Corp., New York (1962) p. 502.

45. BRADY R.O., BRADLEY R.M. and TRAMS E.G. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3093-3098.
46. Mc CLURE W.R. and LARDY H.A. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3591-3596.
47. HAYNES R.C. (1972) in "Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" (M.A. Mehlman and R.W. Hanson eds) Acad. Press, New York, pp. 239-252.
48. WIMHURST J.M., MANCHESTER K.L. and HARRIS E.J. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 372, 72-84.
49. MOSS J. and LANE M.D. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4944-4951.
50. LANDMAN A.D. and DAKSHINAMURTI K. (1975) Biochem. J. 145, 545-548.
51. BLOCH K. and VANCE D. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 263-298.

Imprimé par Médecine et Hygiène, Genève, Suisse.

